

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
24. Oktober 2002 (24.10.2002)

PCT

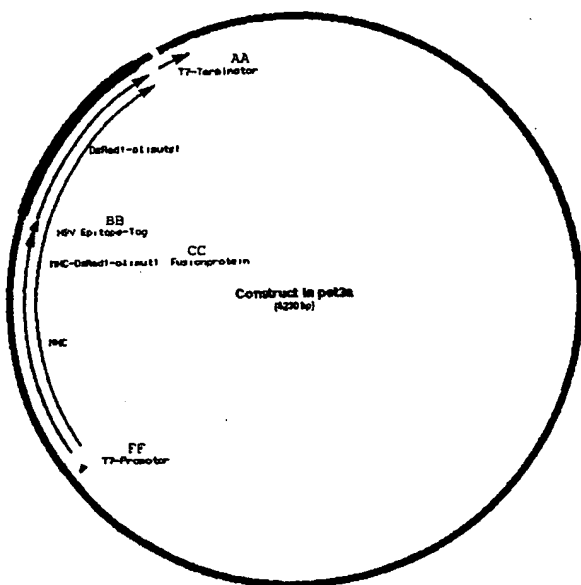
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/083906 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/62, C07K 14/705
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/03995
- (22) Internationales Anmeldedatum:
10. April 2002 (10.04.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
101 17 858.1 10. April 2001 (10.04.2001) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): GSF-FORSCHUNGSZENTRUM FUER UMWELT UND GESUNDHEIT GMBH [DE/DE]; Ingolstaedter Landstrasse 1, 85764 Oberschleissheim (DE).
- (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NEUMANN, Markus [DE/DE]; Sophienweg 8, 85716 Unterschleissheim (DE). ERFLE, Volker [DE/DE]; Laplacestrasse 4, 81679 Muenchen (DE). WOLFF, Horst [DE/DE]; Boschlingstrasse 17, 81677 Muenchen (DE). BUSCH, Dirk [DE/DE]; Liendlweg 3, 81929 Muenchen (DE).
- (74) Anwalt: SKUHRA, Udo; Reinhard, Skuhra, Weise & Partner GbR, Friedrichstrasse 31, 80801 Muenchen (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MHC TETRAMERS

(54) Bezeichnung: MHC-TETRAMERE



Schematische Darstellung einer MHC-DsRed Expressions-Kassette im Vektor pet3a.

SCHEMATIC REPRESENTATION OF AN MHC-DsRed EXPRESSION CASSETTE
IN VECTOR pet3a

AA T7 TERMINATOR
BB HSV EPIOTOPE TAG
CC FUSION PROTEIN
FF T7 PROMOTER

(57) Abstract: The invention relates to MHC tetramer fusion proteins, to MHC monomer fusion proteins, to DNA encoding an MHC fusion protein as well as to RNA that provides an MHC monomer fusion protein after transcription. The invention further relates to the use of a DsRed protein as a means for tetramerizing MHC molecules, to methods for producing MHC and DsRed containing fusion proteins and to methods for producing MHC tetramers. The invention also describes methods for examining an antigen-specific cellular immune response, especially for identifying T lymphocytes that carry specific T cell receptors on their cell surface, uses of the MHC monomers and tetramers produced according to the invention and test kits containing the MHC monomers or MHC tetramers according to the invention.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft MHC-Tetramer-Fusionsproteine, MHC-Monomer-Fusionsproteine, DNA, die für ein MHC-Fusionsprotein kodiert sowie RNA, die nach Transkription ein MHC-Monomer-Fusionsprotein ergibt. Die Erfindung offenbart weiterhin die Verwendung eines DsRed-Proteins als Mittel zur Tetramerisierung von MHC-Molekülen, Verfahren zur Herstellung von MHC und DsRed enthaltenden Fusionsproteinen und Verfahren zur Herstellung von MHC-Tetrameren. Die Erfindung beschreibt weiterhin Verfahren zur Untersuchung einer Antigen-spezifischen zellulären Immunantwort, insbesondere zum Nachweis von T-Lymphozyten, die spezifische T-Zell-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche tragen, Verwendungen der erfindungsgemäß hergestellten MHC-Monomere und -Tetramere sowie Testsysteme, die die MHC-Monomere oder MHC-Tetramere der Erfindung enthalten.

BEST AVAILABLE COPY

WO 02/083906 A1



(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),

OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

MHC-TETRAMERE

Die Erfindung betrifft MHC-Tetramer-Fusionsproteine, MHC-Monomer-Fusionsproteine, DNA, die für ein MHC-Fusionsprotein kodiert sowie RNA, die nach Transkription ein MHC-Monomer-Fusionsprotein ergibt. Die Erfindung offenbart weiterhin die Verwendung eines DsRed-Proteins als Mittel zur Tetramerisierung von MHC-Molekülen, Verfahren zur Herstellung von MHC und DsRed enthaltenden Fusionsproteinen und Verfahren zur Herstellung von MHC-Tetrameren. Die Erfindung beschreibt weiterhin Verfahren zur Untersuchung einer Antigen-spezifischen zellulären Immunantwort, insbesondere zum Nachweis von T-Lymphozyten, die spezifische T-Zell-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche tragen, Verwendungen der erfindungsgemäß hergestellten MHC-Monomere und -Tetramere sowie Testsysteme, die die MHC-Monomere oder MHC-Tetramere der Erfindung enthalten.

Das zelluläre Immunsystem erkennt Antigenstrukturen über Vermittlung durch Oberflächenmoleküle des "Major Histocompatibility Complex" (MHC). Antigen-präsentierende Zellen (APC) bereiten Antigene zu kurzen Peptiden auf, die nach Bindung in einer speziellen Peptid-Bindungsgrube des MHC-Moleküls präsentiert werden und so von T-Zellen erkannt werden können. Die spezifische Erkennung des Epitops (Peptidfragmentes) durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) erfordert dabei die gleichzeitige Interaktion mit dem MHC Molekül ("MHC-Restriktion").

Die Bindung von MHC/Peptid Komplexen am TCR ist durch eine sehr niedrige Affinität charakterisiert, insbesondere durch eine sehr schnelle Dissoziation (K^{off}) des MHC vom TCR. Von daher ist es nicht möglich, T-Zellen direkt über die Verwendung einer löslichen Form des natürlichen Liganden (z.B. als Fluoreszenz-markierten MHC/Peptid Komplex) in Abhängigkeit ihrer Epitop-Spezifität zu markieren. Durch die Multimerisierung von MHC/Peptid Komplexen zu z.B. MHC-Tetrameren ließ sich zeigen, daß die relative Avidität der Epitop-spezifischen Bindung an der T-Zell-Oberfläche soweit erhöht werden kann, daß eine spezifische T-Zell-Markierung ermöglicht wird. Hierzu werden lösliche MHC-Moleküle in vitro generiert, spezifisch biotinyliert und über Fluoreszenz-markiertes Strep-

tavidin multimerisiert. Mit Hilfe solcher Reagentien kann die antigen-spezifische zelluläre Immunantwort im Tiermodell und direkt am Menschen sehr genau untersucht werden.

Die Herstellung von MHC-Tetramer-Reagenzien involviert eine Reihe komplexer biochemischer Reaktionen, wobei rekombinant exprimierte Proteine i.d.R. nach der Denaturierung korrekt in vitro gefaltet, biotinyliert und anschließend im richtigen molaren Verhältnis zur Tetramerbildung gebracht werden müssen.

Gegenwärtig werden die meisten MHC-Tetramer-Reagenzien über ein sehr komplexes und aufwendiges Verfahren hergestellt. Zunächst werden MHC-Komponenten als rekombinante Proteine in E.coli exprimiert und aus inclusion bodies aufgereinigt. Nach Harnstoffdenaturierung werden die MHC-Anteile in der Gegenwart von hohen Peptid/Epitop-Konzentrationen durch Verdünnung in einem Arginin-reichen Puffer mit Glutathion-Redoxsystem gefaltet und isoliert. In einem weiteren Schritt wird das rekombinante MHC biotinyliert und nach erneuter Aufreinigung über Streptavidin multimerisiert. Das für die Multimerisierung verwendete Streptavidin ist für den späteren optischen Nachweis mit Phycoerythrin markiert. Diese Fluoreszenz-gekoppelten MHC-Multimer Reagenzien können mit komplexen T-Zellgemischen inkubiert und so selektiv die MHC/Peptid-spezifischen Zellen innerhalb der Gesamtpopulation (z.B. per FACS-Analyse) bestimmt werden.

Die bestehende Technik der Herstellung von MHC-Multimer Reagenzien ist sehr aufwendig, empfindlich (z.B. die Effizienz der Biotinylierungsreaktion) und kosten-intensiv. Eine Vereinfachung des Herstellungsverfahrens würde den breiteren Einsatz dieser Methodik in der Grundlagenforschung wie auch im klinisch-diagnostischen Bereich wesentlich beschleunigen.

Es ist damit eine Aufgabe der Erfindung ein neues Mittel bereitzustellen, welches die Tetramerisierung von MHC-Molekülen verbessert und die oben dargestellten Nachteile vermeidet.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das in Anspruch 1 näher beschriebene MHC-Tetramerisierungsmittel gelöst. Bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen sowie den weiteren, unabhängigen Ansprüchen.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand einzelner Ausgestaltungen näher beschrieben. Die Erfindung ist jedoch nicht auf diese speziellen Ausführungsformen beschränkt, sondern der Umfang der Erfindung wird durch die Patentansprüche in Verbindung mit der Beschreibung definiert.

Erfindungsgemäß wird eine Tetramerbildung von MHC-Molekülen unter Verwendung des DsRed-Proteins durchgeführt. DsRed ist ein rot fluoreszierendes Protein aus der Seeanemone *Discosoma sp.* und gehört wie das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) zu einer Familie fluoreszierender Proteine. Nur beispielsweise wird hier auf die Veröffentlichung von Matz, M.V. et al., *Nature Biotech.* 17: 969 – 973, 1999 hingewiesen. Die Struktur von DsRed ist bekannt, und es kann beispielsweise von CLONTECH^R in rekombinanter Form bezogen werden. Weiterhin ist bekannt, daß DsRed sowohl in vivo wie in vitro Tetramere ausbilden kann. Die Struktur dieser Tetramere ist ebenfalls bekannt (*Nature Structural Biology*, 2000, Seiten 1133 – 1138).

Überraschend und unerwartet wurde von den Erfindern nunmehr festgestellt, daß DsRed auch zur Tetramerisierung von MHC-Molekülen und gleichzeitig für den späteren optischen Nachweis des Mittels herangezogen werden kann. Weder die Bindung des Antigen-spezifischen Peptids an MHC-Moleküle noch die Bindung des MHC-Tetramers an die T-Zell-Rezeptoren einer T-Zelle wird durch die DsRed vermittelte Tetramerisierung gestört oder nachteilig beeinflusst. Insbesondere kann durch DsRed vermittelte Tetramerisierung die Tetramer-Herstellung wesentlich vereinfacht, beschleunigt und kostengünstig effizienter gestaltet werden, ohne die Funktionalität zu behindern. Der Nachweis des DsRed-Proteins erfolgt durch fluoreszenzdetektierende Verfahren in an sich bekannter Weise, wie es im Stand der Technik beispielsweise in den von den CLONTECH^R Laboratories, Inc. veröffentlichten Protokollen dargestellt wird (CLONTECH^Rniques XIV (4): 2 – 6). Dazu gehören neben FACSanalysen auch Fluoreszenzmikroskopie und fluoreszenzbasierende Scanningverfahren (z.B. Fluorimager von Molecular Dynamics).

Erfindungsgemäß wird das DsRed-Fluoreszenzprotein zur Tetramerisierung sowohl von MHC-Klasse I als auch MHC-Klasse II –Molekülen eingesetzt.

Beispiele für einsetzbare Histokompatibilitätsantigene sind MHC-Klasse I-Antigene, beispielsweise HLA-A (zum Beispiel A1, A2, A3, A11, A24, A31, A33 und A38), HLA-B und HLA-C, MHC-Klasse II-Antigene, beispielsweise HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DX, HLA-DO, HLA-DZ und HLA-DP.

MHC-Tetramere sind Komplexe aus vier MHC-Molekülen, die mit einem spezifischen Peptid assoziiert sein können und durch ihre Bindung an ein Fluorochrom nachweisbar sind. Diese Komplexe binden eine spezielle Gruppe von T-Zell-Rezeptoren auf CD8⁺-T-Zellen. Bei Vermischung der so erhaltenen Tetramere mit PBLs oder Gesamtblut und Nachweis zur Verwendung durchflusszytometrischer Verfahren kann die Menge aller T-Zellen, die für ein Peptid spezifisch sind und das damit verbundene Allel analysiert werden. Es ist also möglich, die zelluläre Immunantwort gegen ein spezifisches Peptid zu bestimmen.

MHC-Tetramere gemäß der Erfindung können beispielsweise eingesetzt werden, um die zelluläre Immunantwort unter nachfolgenden Bedingungen zu studieren:

1. Bei allen Virusinfektionen, beispielsweise HIV, HBV, CMV, HPV, HCV, Influenza und Masern und viele anderen.
2. Bakterielle Infektionen
3. Parasiteninfektionen, beispielsweise Malaria.
4. Tumoren, einschließlich Brust-Prostata, Melanom-, Colon-, Lungen- und Cervixtumoren.
5. Autoimmunitätskrankungen einschließlich Multiplesklerose, Diabetes, Rheumatoide Arthritis usw.
6. Allergische Erkrankungen wie Asthma bronchiale, Neurodermitis usw.

Durch die Tetramer-Technologie ist es möglich, individuelle T-Zellen auf Grundlage der Spezifität der Bindung an den MHC-Peptid-Komplex zu identifizieren. Aufgrund der Spezifität der Tetramere bieten sich folgende Vorteile:

- Das Verfahren ist quantitativ;
- Es sind keine radioaktive Markierungen einzusetzen;

- Das Verfahren arbeitet schnell, so daß auch frische Blutproben oder Gewebekulturproben analysierbar sind, und große Probenmengen verarbeitet werden können;
- Durch die Verwendung eines Durchflusssytometers können die Zellen nicht nur mit dem Tetramer-Fluorochrom DsRed, sondern auch mit anderen Zelloberflächenmarkern zur gleichen Zeit markiert werden;
- Es können einheitliche Subpopulationen durch die Durchflusssytometrie sortiert werden und im Wege weiterer Testsysteme auf ihre Funktionalität überprüft werden;
- Spezifische T-Zellen können aus Blutproben ohne vorherige in vitro-Kultur analysiert werden;
- Alle spezifischen T-Zellen sind nachweisbar, unabhängig von ihrem funktionellem Status, wie z.B. zytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen usw.

Ausgangspunkt der Erfindung ist die Herstellung eines Fusionsproteins aus einem für ein MHC-Protein kodierenden Gen und aus einem für ein DsRed-Protein kodierenden Gen. Hierzu werden bevorzugt beim MHC-Molekül die Transmembran-Anteile und die zytosolischen Anteile entfernt, um eine lösliche Form des MHC-Moleküls zu erhalten. Der MHC-Anteil und der DsRed-Anteil werden bevorzugt durch ein Linkermolekül miteinander verknüpft. Das nach Entfernung der transmembranen und zytosolischen Anteile erhaltene trunkierte MHC-Molekül wird dann über das Linker-Molekül an den N-Terminus von DsRed gekoppelt.

Es ist insbesondere darauf zu achten, daß durch das Einfügen des Linker-Moleküls die Tetramerbildung über den DsRed-Anteil nicht behindert wird. Da die räumliche Struktur des DsRed-Moleküls bekannt ist (je zwei N-terminale Regionen liegen sich gegenüber), können die Linker-Moleküle entsprechend gestaltet werden. Besonders bevorzugt wird ein Aminosäurelinker verwendet. Ein Beispiel für einen flexiblen Aminosäurenlinker ist ein Derivat des lacZ-Alpha-Peptids [angegeben im „single letter code“: MASSG GTGGS GGTGG SGGGG ASPSL VPSSD PLVTA ASVLE FALAG AQE] oder der synthetische flexible Linker Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr[Gly Gly Ser Gly Gly Thr]₃, der zwischen den beiden Proteinanteilen des Fusionsproteins MHC und DsRed eingefügt wird und die Tetramerisierung sterisch nicht behindert.

Selbstverständlich stehen dem Fachmann auch andere Aminosäurelinker zur Verfügung. Entsprechende Techniken sind bekannt. Es ist aber auch möglich, die Proteine selbst durch beispielsweise peptidchemische Bindungen über Crosslinker oder ähnliche Verfahren miteinander zu verbinden. Beispielsweise sei auf Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY), 1989 und Ansubel F.M. et al., 1994, Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, NY) und nachfolgende Auflagen hingewiesen.

In einer bevorzugten Ausgestaltungsform der Erfindung kann auch eine Variante des Aminosäurelinkers eingesetzt werden, die zumindest eine Erkennungssequenz für eine Protease enthält, beispielsweise den Faktor Xa. Hierdurch wird eine vereinfachte Abspaltung der MHC-Moleküle vom DsRed-Tetramer ermöglicht.

Folgende weitere Varianten des Linkers zwischen MHC und DsRed können im Kontext der vorliegenden Erfindung verwendet werden:

lacZ α -Linker:

E Q A G A L A F E L V S A A T V L P D S S P V L S

Standard-Serin-Glycin-Linker:

S G G S S G G G

Extrem langer Standard-Linker:

S S S G G G S S G G S S G G G

Die erfindungsgemäß hergestellten rekombinanten MHC-DsRed-DNA-Moleküle können in an sich bekannter Weise in rekombinanter Form in Expressionsplasmiden kloniert und in prokaryonten Zellen, bevorzugt E.coli-Zellen, oder in eukaryonten Zellen, beispielsweise Hefezellen oder etablierten menschlichen Zellen, exprimiert werden. Geeignete Techniken stehen auf diesem Fachgebiet zur Verfügung, und es wird hier wiederum auf die oben genannten Laborhandbücher verwiesen. Die erhaltenen rekombinanten monomeren DsRed-MHC-Proteinmoleküle werden durch an sich bekannte Verfahren aufgereinigt und können dann in vitro oder in vivo tetramernisiert werden.

Zur Tetramerisierung werden die löslichen Versionen der MHC-DsRed-Moleküle, wahlweise, insbesondere bei MHC-I, in Kombination mit β_2 -Mikroglobulin, zur Tetramerisierung gebracht. Die Tetramerisierung findet bevorzugt in Gegenwart des Antigen-spezifischen Peptids statt. Die Ausbildung von Tetrameren ist eine dem DsRed-Protein inne wohnende Eigenschaft und es bedarf nicht mehr der aus dem Stand der Technik bekannten komplizierten, zeitraubenden Methoden wie Biotinylierungen, Streptavidin-Bindungen sowie Fluorochrom-Kopplungsreaktionen, um die Tetramerbildung und die Fluoreszenzentwicklung zu gewährleisten. Bei der Erfindung wirkt das eingesetzte DsRed-Protein sowohl als Tetramerisierungsagens als auch als fluoreszierendes Mittel.

Das an sich bekannte DsRed-Protein kann selbstverständlich durch an sich bekannte Methoden abgeändert werden, um beispielsweise die Tetramerisierung, die Bindung an das MHC-Molekül und/oder die Fluoreszenzaktivität zu verbessern. Üblicherweise werden für derartige Mutagenisierungen zufallsgenerierte Mutanten auf ihre neuen Charakteristika ausgetestet, oder es wird in gezielter Weise nach Strukturuntersuchungen eine Mutagenisierung des DsRed-Proteins vorgenommen, um seine Aktivitäten zu verbessern. Selbstverständlich sind auch andere DsRed-ähnliche Proteine einsetzbar, die aus anderen Organismen gewonnen wurden. Voraussetzung hierbei ist natürlich immer ihre Fähigkeit zur Ausbildung von Tetra- bzw. Multimeren und ihre fluoreszierende Aktivität.

Am DsRed-Protein können so z.B. diverse Mutationen vorgenommen werden, um seine Brauchbarkeit innerhalb des Fusionsproteins zu steigern bzw. ganz neue Anwendungsmöglichkeiten zu schaffen.

Einige dieser DsRed-Mutanten wurden bereits erfolgreich von den Erfindern in verschiedenen Anwendungen getestet, andere wurden von diversen Arbeitsgruppen in anderem Zusammenhang publiziert und wieder weiteren liegen theoretische Überlegungen zugrunde, die sich auf die bekannte Raumstruktur und Kenntnisse über die Biochemie fluoreszierender Proteine stützen.

Grundsätzlich liegt der Schwerpunkt auf solchen Mutationen, die die Ausbildung der Fluoreszenz beschleunigen oder verstärken und solchen, die die Eigenschaften zur spezifischen Tetramerisierung verbessern und zur unspezifischen Aggregation verringern. Ausserdem

sind Mutanten interessant, die die spektralen Eigenschaften verändern, da dies neue Anwendungsmöglichkeiten bei der Detektion der MHC-Tetramere bieten kann. Besonders Verschiebungen der Emission weiter in den langwelligen Bereich könnten von Vorteil sein, da dies die Fluoreszenzdetektion mittels FACS erleichtern könnte.

Alle Aminosäuren sind im Standard ein-Buchstaben-Code angegeben:

Verbesserung/Veränderung der Tetramerisierungseigenschaften

- R2A, K5E, K9T: Verhinderung von unspezifischen Protein-Aggregaten
- Addition diverser hydrophober Aminosäuren direkt am C-Terminus des Proteins zur Stabilisierung der Tetramerisierung, wie z.B. des Oktapeptids "L L I L A I L H"
- Austausch nicht für die Proteinstruktur benötigter, problematischer Aminosäuren durch geeignetere AS, wie z.B. Ersatz von R und K durch S oder F durch T und ähnliches.

Veränderung der Fluoreszenz-Eigenschaften

- A105V, I161T, S197A: Verbesserung der Chromophor-Bildung
- V105A, S197T: Farb-wechselnde Mutante

-K83M, K83R, Y 120H, K83W,	Veränderung der Emissions- bzw.
K70R, Y38L, H41W, N42D	Anregungseigenschaften

Die oben genannten Abkürzungen sind so zu verstehen, dass z.B. R2A bedeutet, dass Aminosäure R an Position 2 in der Gesamtsequenz durch Aminosäure A ersetzt ist.

Zusammenfassend ist der Begriff „DsRed-Fluoreszenzprotein“ oder „rekombinantes DsRed-Fluoreszenzprotein“ nicht auf ein spezielles Protein beschränkt, sondern umfasst alle Varianten und Derivate der bekannten DsRed-Sequenz, die dessen Funktion im Rahmen der vorliegenden Erfindung erfüllen können, d.h. zur Tetramerisierung von MHC-Molekülen sowie zum optischen Nachweis geeignet sind. Bevorzugte Beispiele sind oben angegeben, wobei diese selbstverständlich nicht isoliert betrachtet werden sollen, sondern jederzeit auch Kombinationen der einzelnen Veränderungen zur Erzielung eines vorteilhaften DsRed-

Proteins vom Begriff „DsRed-Fluoreszenzprotein“ oder „rekombinantes DsRed-Fluoreszenzprotein“ mit umfasst sind.

Modifikationen der Sequenzen, wie beispielsweise Deletionen, Insertionen oder Substitutionen in der Sequenz, die im sich ergebenden Protein-Molekül sogenannte "stille" Veränderungen (silent changes) erzeugen, werden ebenfalls als innerhalb des Bereichs der vorliegenden Erfindung liegend betrachtet.

Vorzugsweise sind derartige Aminosäure-Substitutionen das Ergebnis der Ersetzung einer Aminosäure durch eine andere Aminosäure mit ähnlichen strukturellen und/oder chemischen Eigenschaften, d.h. konservative Aminosäureersetzungen. Aminosäuresubstitutionen können auf Grundlage der Ähnlichkeit in der Polarität, Ladung, Löslichkeit, Hydrophobie, Hydrophilie, und/oder der amphipatischen (amphiphilen) Natur der involvierten Reste vorgenommen werden. Beispiele für unpolare (hydrophobe) Aminosäuren sind Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin, Prolin, Phenylalanin, Tryptophan und Methionin. Polare neutrale Aminosäuren schließen Glycin, Serin, Threonin, Cystein, Thyrosin, Asparagin und Glutamin ein. Positiv geladene (basische) Aminosäuren schließen Arginin, Lysin und Histidin ein. Und negativ geladene (saure) Aminosäuren schließen Asparaginsäure und Glutaminsäure ein.

"Insertionen" oder "Deletionen" bewegen sich typischerweise im Bereich von ein bis fünf Aminosäuren. Der erlaubte Variationsgrad kann experimentell durch systematisch vorgenommene Insertionen, Deletionen oder Substitutionen von Aminosäuren in einem Polypeptidmolekül unter Verwendung von DNA-Rekombinationstechniken und durch Untersuchen der sich ergebenden rekombinanten Varianten bezüglich ihrer biologischen Aktivität ermittelt werden.

Daraus ergibt sich, daß, wo der Begriff "DsRed-Protein" entweder in der Beschreibung oder in den Ansprüchen verwendet wird, er alle derartigen Modifikationen und Varianten umfaßt, die ein biologisch äquivalentes DsRed-Protein zur Folge haben.

Die erfindungsgemäß ausgebildeten Tetramere werden mit der zu analysierenden Zellpopulation gemischt. Unter Zellpopulation versteht man insbesondere PBMC-Populationen (periphere Blut mononukleäre Zellen) oder T-Lymphozyten (T-Zellen). Nur T-Zellen mit T-

Zell-Rezeptoren, die zur Bindung an die spezielle MHC-Peptid-Kombination, die im Tetramer vorliegt, befähigt sind, können an das Tetramer binden. Derartige Zellen werden durch das DsRed-Fluorochrom markiert. Selbstverständlich können auch weitere Fluoreszenzmarkierungen zusätzlich zum DsRed eingesetzt werden. Beispielsweise kann ein für einen T-Zell-Marker spezifischer monoklonaler Antikörper in Kombination mit einem unterschiedlichen Fluorochrom, beispielsweise FITC, eingesetzt werden. Die Zellen können dann unter Verwendung eines Durchflusszytometrierfahrens analysiert werden. Der Anteil der CD8⁺ T-Zell-Population, die mit Hilfe des Tetramers positiv gefärbt wurde, wird bestimmt. Mit Hilfe von Fluoreszenznachweisverfahren, beispielsweise der Durchflusszytometrie, können die MHC-Tetramer-T-Zell-Komplexe auch sortiert werden und beispielsweise die so erkannten T-Zellen in einen Patienten appliziert werden.

In einer weiteren Ausgestaltungsform der Erfindung liegen die MHC-Monomere oder -Tetramere in einem Testsystem vor, das in Form eines Kits angeboten werden kann.

Der Lösungsansatz der Erfindung reduziert die zur Herstellung von MHC-Multimer-Reagenzien benötigten Komponenten (2 MHC-Ketten [z.B. MHC-I: schwere Kette und beta-2-Mikroglobulin, MHC-II: alpha und beta Kette], d-Biotin, Peptid, Streptavidin-PE) auf 4 (MHC-linker-DsRed Fusionsprotein, 2. MHC-Kette und das jeweilige MHC-bindende Peptid/Epitop). Außerdem wird die hohe Anzahl der benötigten Reaktionsabläufe (Extraktion von rekombinanten MHC Anteilen, in vitro Faltung in Gegenwart des Peptides, Biotinylierung, chromatographische Aufreinigung, Multimerisierung unter Zugabe von Streptavidin-PE, weitere Reinigung über Molekularsiebchromatographie) auf z. B. 3 (Extraktion von rekombinantem HLA-linker-DsRed, Refolding in Anwesenheit des Peptids und anschließende Aufreinigung) reduziert. Alleine die Reduktion der Anzahl der notwendigen Aufreinigungsschritte, welche immer mit starken Verlusten verbunden sind, steigert die Gesamtausbeute an Reagenz deutlich. Außerdem ist der generierte MHC-Multimer Komplex relativ klein und sehr viel stabiler, wodurch Vorteile gegenüber bisher verwendeten Reagenzien entstehen.

Aus den vorgenannten Gründen ergeben sich folgende Möglichkeiten für *in vivo* Applikationen von DsRed-MHC Tetrameren:

Konventionelle MHC-Tetramer Reagenzien werden – wie oben dargestellt - i.d.R. mit Hilfe von Avidin oder Streptavidin hergestellt. Avidin bzw. Streptavidin hat allerdings nach intravenöser Applikation eine sehr kurze *in vivo* Halbwertszeit, was insbesondere durch eine schnelle Aufnahme in der Leber bedingt ist. Entsprechend ist auch die *in vivo* Halbwertszeit konventioneller MHC-Tetramer-Reagenzien nur sehr kurz. Für DsRed-MHC-Tetramere wird eine deutlich längere *in vivo* Halbwertszeit erwartet; dazu ist der Fluoreszenzfarbstoff selber sehr resistent gegenüber schädigenden bzw. degradierenden *in vivo* Einflüssen. *In vivo* Anwendungen mit MHC-Multimeren sind von Bedeutung für grundlagenwissenschaftliche Fragestellungen (z.B. *in vivo* Färbung antigen-spezifischer T-Zellen und nachfolgende Detektion im Gewebeschnitt, antigen-spezifische Immunsierung bzw. Toleranz-Induktion) als auch klinische Anwendungen (antigen-spezifische Immunsierung bzw. Toleranz-Induktion, Konjugation der Reagenzien mit immunmodulatorischen Substanzen bzw. Tracern).

Die vorliegende Erfindung wird nunmehr anhand von Beispielen und den beigefügten Abbildungen verdeutlicht, die Folgendes zeigen:

Abb. 1.: Schematische Darstellung einer MHC-DsRed Expressions-Kassette im Vektor pet3a. Dieses Konstrukt ist beispielhaft für verschiedene weitere Varianten. Die einzelnen Bestandteile sind in verschiedenen Farben markiert. Blau: Promotor bzw. Terminator für die überexpression in *E.coli*. Rot: Leserahmen für eine Mutante des DsRed-Proteins. Grau: Leserahmen für die schwere Kette des MHC-Proteins. Grün: Fusionsprotein aus MHC und DsRed. Cyan: Linkerregion, in diesem Fall repräsentiert durch ein Peptid dass zugleich ein Epitop-Tag darstellt. Zu beachten ist, dass der Leserahmen für DsRed kein internes Startcodon enthält und somit praktisch nur Fusionsprotein der vollen Länge expriert werden kann.

Abb. 2.: Schematische Darstellung der wesentlichen Bestandteile einer weiteren MHC-DsRed Expressions-Kassette. Diese besitzt im Gegensatz zum Konstrukt aus Abbildung 1 kein Epitop-Tag als Linkerpeptid sondern einen Linker der sich aus mehreren Serinen und Glycinen zusammensetzt. Die Flexibilität des Linkers und die Beweglichkeit der miteinander verbundenen Proteine ist in diesem Fall wahrscheinlich deutlich höher.

Abb. 3.: MHC-Protein (Schwerekette und β_2 -Mikroglobulin). Links ist die Darstellung gemäss der Sekundärstruktur des Proteins zu sehen, wie sie später auch in den Abbildungen 5 und 6 der Fusionsproteine verwendet wird (Helikale Strukturen in rot, β -Faltblätter in blau, unstrukturierte Regionen und Turns in weiss). Rechts zur Verdeutlichung die gesonderte Darstellung von schwerer Kette (in grün) und β_2 -Mikroglobulin (in purpur).

Abb. 4.: Räumliche Darstellung des *DsRed1*-Tetramers. Die einzelnen Ketten des Homo-Tetramers sind in den Farben Orange, Rot, Grün und Cyan dargestellt. Rechts ist eine Seitenansicht, links eine Aufsicht auf das Tetramer zu sehen. Deutlich zu erkennen ist die symmetrische und kompakte Anordnung des Tetramers, die es zur beabsichtigten Anwendung befähigt.

Abb. 5.: MHC-*DsRed* Tetramer

Der MHC-Tetramer-Verband wurde gemäss den Erläuterungen von Abbildung 4 und 5 dargestellt. Der C-Terminus jeweils eines MHC-Proteins wurde computerunterstützt an den N-Terminus einer Untereinheit des *DsRed*-Tetramers angefügt.

Die Darstellung zeigt nur eine mögliche Anordnung der MHC-Moleküle im Raum, die durch den flexiblen Peptidlinker einen Bewegungsspielraum erhalten. Diese Ansicht zeigt das *DsRed*-Tetramer von der Seite

Abb. 6.: MHC-*DsRed* Tetramer

Erläuterungen wie bei Abbildung 5. Diese Ansicht zeigt das *DsRed*-Tetramer von oben.

Abb. 7.: MHC-*DsRed*-Fusionsprotein exprimierende Bakterien-Kolonien.

BL21 (DE3) Bakterien wurden mit pET3a/H2-K^d-*DsRed* transformiert und auf Ampicillin-haltiger Agarose kultiviert. Zu erkennen sind einzelne Bakterien-Kolonien mit tiefroter Farbe. Die rote Farbe kommt durch den *DsRed*-Anteil des rekombinant exprimierten Fusionsproteins.

Abb. 8.: Rekombinante Expression von MHC-*DsRed*-Fusionsprotein

BL21 (DE3) Bakterien wurden mit pET3a/H2-K^d-*DsRed* transformiert. Nach Wachstum in Flüssigkultur (LB, 100 μ g/ml auf Carbenicillin) wurde bei OD₆₀₀ von ca. 0.8 ein Aliquot

entnommen („Nullwert“), der Rest wurde für 3 weitere Stunden in Gegenwart von IPTG (0.4 mM) inkubiert. Proben von „Nullwert“ und „3 h“ wurden anschließend gewaschen, in dH₂O lysiert, in Proteingel-Probenpuffer aufgekocht, und nachfolgend über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Abbildung zeigt ein Proteingel nach Coomassie-Färbung von zwei verschiedenen Kulturen (links MHC-Fusionsprotein mit „Wildtyp“ *DsRed* bzw. rechts mit einer *DsRed*-Mutante zur Optimierung der Faltungseigenschaften). Man beachte die deutliche zusätzliche Bande nach 3 h IPTG Induktion bei ca. 65 kD, die dem rekombinanten Fusionsprotein entspricht.

Beispiele:

Aufgrund der hervorragenden Fluoreszenz- und Tetramerisierungseigenschaften in verschiedenen Versuchen wurden Experimente durchgeführt um die Ausbildung von MHC-Tetrameren durch die Fusion an das rot fluoreszierende Protein *DsRed* zu erreichen.

Klonierung der Expressionskonstrukte:

Alle Expressionskonstrukte wurden durch Standard-Klonierungsmethoden erzeugt, ausgehend von dem Vektor p*DsRed*1-N1 (Clontech), der als PCR-Template für alle weiteren Varianten des *DsRed*-Proteins diente.

Als Expressionsvektor des vollständigen Konstrukts und als Quelle des MHC-Proteins wurde der Vektor pET3a/H2-K^d verwendet. Mittels verschiedener Klonierungsstrategien, die die bereits vorhandene Restriktionsschnittstellen im Zielvektor pET3a/H2-K^d nutzten, wurden die für diverse Varianten von *DsRed* kodierende DNA eingefügt. Auf diese Weise wurden Vektoren erzeugt (wie z.B. pET3a/H2-K^d-*DsRed*), die unter der Kontrolle des T7-Promotors ein Fusionsprotein aus MHC und einer *DsRed*-Variante enthielten, die über unterschiedliche Linkerpeptide miteinander verknüpft waren (siehe Abb.1 und Abb.2).

Als Translationsstart war dabei nur das Start-ATG des MHC-Proteins vorhanden, aber kein internes Start-Codon am Linker oder am *DsRed*. Die Expression verkürzter Proteine kann dadurch weitgehend ausgeschlossen werden.

Folgende Sequenz aus dem Vektor pET3a/H2-K^d-SSGGlink*DsRed* zeigt beispielhaft die Abfolge der Aminosäuren der letzten 12 AS des MHC-Moleküls und der ersten 12 AS einer *DsRed*-Variante (in kursiv). Dazwischen befindet sich ein verwendetes Linkerpeptid (in fett gedruckt).

K L P P S T V S N T A S G G S S G G G V A S S E N V I T E F M

Die nächste Sequenz, die aus dem Vektor pET3a/H2-K^d-direct*DsRed* stammt, zeigt wieder die Abfolge der Aminosäuren der letzten 12 AS des MHC-Moleküls und der ersten 12 AS einer *DsRed*-Variante (in kursiv). Dazwischen befindet sich ein Epitop-Tag, der als Linker fungieren kann und der ausserdem über seine Fähigkeit, spezifische Antikörper zu binden, nachgewiesen werden kann (in fett gedruckt).

K L P P S T V S N T A S Q P E L A P E D P E D G G H D K V R S S
K N V I K E F M

Für eine detaillierte Darstellung der MHC-*DsRed*-Expressionskassette wird auf Abb. 1 und 2 verwiesen.

DsRed-MHC-Fusionsproteine wurden in pET3a (Novagen) Vektoren kloniert und anschließend in die Expressionsbakterien BL21(DE3) transformiert. Auch ohne gezielte Expressionsinduktion kann in diesem System eine geringe Generierung des rekombinanten Proteins beobachtet werden. Diese Basalexpression des *DsRed* Fusionsproteins ist bereits direkt an den Bakterienkolonien erkennbar, die nach kurzer Zeit eine tiefrote Farbe aufweisen (Abb.7) Induziert man die Transkription des rekombinanten Proteins durch Zugabe von IPTG, so kommt es zur Überexpression des rekombinanten Proteins (Abb.8). Die Herstellung großer Mengen an rekombinanten MHC-*DsRed* Fusionproteinen konnte sowohl unter Verwendung der Originalsequenz von *DsRed*, als auch unter Verwendung von *DsRed*-Mutanten erreicht werden (Abb.8). Rekombinante MHC Klasse-I Moleküle werden i.d.R. durch *in vitro* Rückfaltung der in „inclusion bodies“ exprimierten und aufgereinigten Teilkomponenten (Schwerekette und β_2 -Mikroglobulin) in Gegenwart hoher Konzentrationen des jeweiligen MHC-bindenden Peptids (Epitop) hergestellt. Exprimiert man *DsRed* in gleicher Weise in „inclusion bodies“ und führt eine identische Aufreinigung und Rückfaltung *in*

vitro durch, so erhält man ein farbgebendes Protein, daß alle Charakteristika von korrekt gefaltetem *DsRed*-Fluoreszenzprotein hat.

Zusammengefaßt zeigen diese Daten, daß zwei wesentliche Grundvoraussetzungen für den erfolgreiche Einsatz von *DsRed*-MHC Tetrameren gegeben sind:

- (1) Große Mengen an MHC-*DsRed*-Fusionsprotein können im bakteriellen Expressionssystem hergestellt werden; dabei zeigt sich bereits bei *in vivo* Expression die „Funktionalität“ des *DsRed*-Anteils im Fusionsprotein durch die typische farbgebende Charakteristik.
- (2) *DsRed*-Fluoreszenzprotein kann unter den für die Herstellung von löslichen MHC-Molekülen optimierten Bedingungen aus „inclusion bodies“ generiert werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. MHC-Tetramer, enthaltend vier MHC-Moleküle sowie ein Tetramerisierungsmittel, dadurch gekennzeichnet, daß das Tetramerisierungsmittel ein DsRed-Fluoreszenzprotein ist.
2. MHC-Tetramer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Tetramerisierungsmittel ein rekombinantes DsRed-Fluoreszenzprotein ist.
3. MHC-Tetramer nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das DsRed-Fluoreszenzprotein über ein Linkermolekül an das MHC-Protein gekoppelt ist.
4. MHC-Tetramere nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Linkermolekül aus mehreren Aminosäuren besteht.
5. MHC-Tetramer nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Linkermolekül so ausgestaltet ist, daß eine Abspaltung der MHC-Moleküle vom DsRed-Protein ermöglicht wird.
6. MHC-Tetramer nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Linkermolekül eine Erkennungssequenz für eine Protease enthält.
7. MHC-Tetramer nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß

sich bei der Tetramerbildung die N-terminalen Abschnitte des DsRed-Proteins gegenüber liegen.

8. MHC-Tetramer nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das MHC-Molekül trunziert ist.
9. MHC-Tetramer nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das MHC-Molekül durch Deletion des Transmembran- und/oder des Cytosolanteils trunziert ist.
10. MHC-Tetramer nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es in Form eines Epitop-spezifischen DsRed- MHC-Peptid-Komplexes, wahlweise in Verbindung mit einem T-Zell-Rezeptor, vorliegt.
11. MHC-Tetramer nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das MHC-Molekül ein Säuger, bevorzugt Maus- oder Human-MHC -Molekül ist.
12. MHC-Monomer-Fusionsprotein, dadurch gekennzeichnet, daß es in Verbindung mit einem DsRed-Fluoreszenzprotein, wahlweise verbunden über ein Linkermolekül, vorliegt.
13. Fusionsprotein nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das MHC-Molekül trunziert ist.
14. Fusionsprotein nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das MHC-Molekül durch Deletion des Transmembran und/oder des Zytosolanteils trunziert ist.

15. DNA, die für ein Fusionsprotein nach Anspruch 12, 13 oder 14 kodiert.
16. RNA, die nach Transkription ein Fusionsprotein nach Anspruch 12, 13 oder 14 ergibt.
17. Prokaryontenzelle oder Eukaryontenzelle, enthaltend eine DNA oder RNA nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche.
18. Verwendung eines DsRed-Proteins als Mittel zur Tetramerisierung oder Multimerisierung von MHC-Molekülen.
19. Verfahren zur Herstellung eines Fusionsproteins nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß
- a) eine für ein MHC-Protein kodierende DNA, wahlweise über einen Linker, mit einer für ein DsRed-Protein kodierenden DNA zu einer für ein Fusionsprotein kodierenden DNA verbunden und das Fusionsprotein exprimiert wird; oder
 - ein MHC-Protein, wahlweise über einen Linker, mit einem DsRed-Protein zu einem Fusionsprotein verbunden wird;
 - b) das Fusionsprotein wahlweise aufgereinigt wird.
20. Verfahren zur Herstellung eines MHC-Tetrameren, dadurch gekennzeichnet, daß
- a) eine für ein MHC-Protein kodierende DNA, wahlweise über über einen Linker, mit einer für ein DsRed-Protein kodierenden DNA zu einer für ein Fusionsprotein kodierenden DNA verbunden und das Fusionsprotein exprimiert wird; oder
 - ein MHC-Protein, wahlweise über einen Linker, mit einem DsRed-Protein zu einem Fusionsprotein verbunden wird;
 - b) das Fusionsprotein wahlweise aufgereinigt wird;

c) das MHC-Fusionsprotein, wahlweise in Anwesenheit der Antigen-spezifischen Peptide, tetramerisiert wird.

21. Verfahren nach Anspruch 20,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Tetramerisierung in Anwesenheit von beta-2-Mikroglobulin erfolgt.
22. Verfahren zur Untersuchung einer Antigen-spezifischen zellulären Immunantwort,
dadurch gekennzeichnet, daß
- a) ein MHC-Tetramer oder seine monomere Form nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche mit T-Zellen, bevorzugt mit CD8+-T-Zellen, in Gegenwart eines Peptids in Kontakt gebracht werden, um T-Antigen-MHC-Tetramere zu erhalten;
 - b) die erhaltenen Tetramere nachgewiesen werden, bevorzugt durch ein Durchflußzytometrie-Verfahren oder andere zur Detektion von Fluoreszenzemissionen geeigneten Detektionsverfahren, wie Fluoreszenzmikroskopie oder Fluoreszenzscanning-Verfahren.
23. Verfahren nach Anspruch 19,
dadurch gekennzeichnet, daß
- a) die T-Zellen in Gesamtblut oder PBLs vorliegend eingesetzt werden, oder
 - b) die T-Zellen aus Lymphknoten bzw. extralymphoiden Geweben eingesetzt werden.
24. Testsystem, enthaltend MHC-Monomere oder MHC-Tetramere nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche.
25. Verwendung von MHC-Tetrameren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche zur Untersuchung einer Antigenspezifischen Immunantwort, zum Nachweis oder zur Sortierung von T-Zellen, die spezifisch T-Zell-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen, und zur weiteren Verwendung so gewonnener T-Zellen zur Rückführung in einen Patienten.

1/8

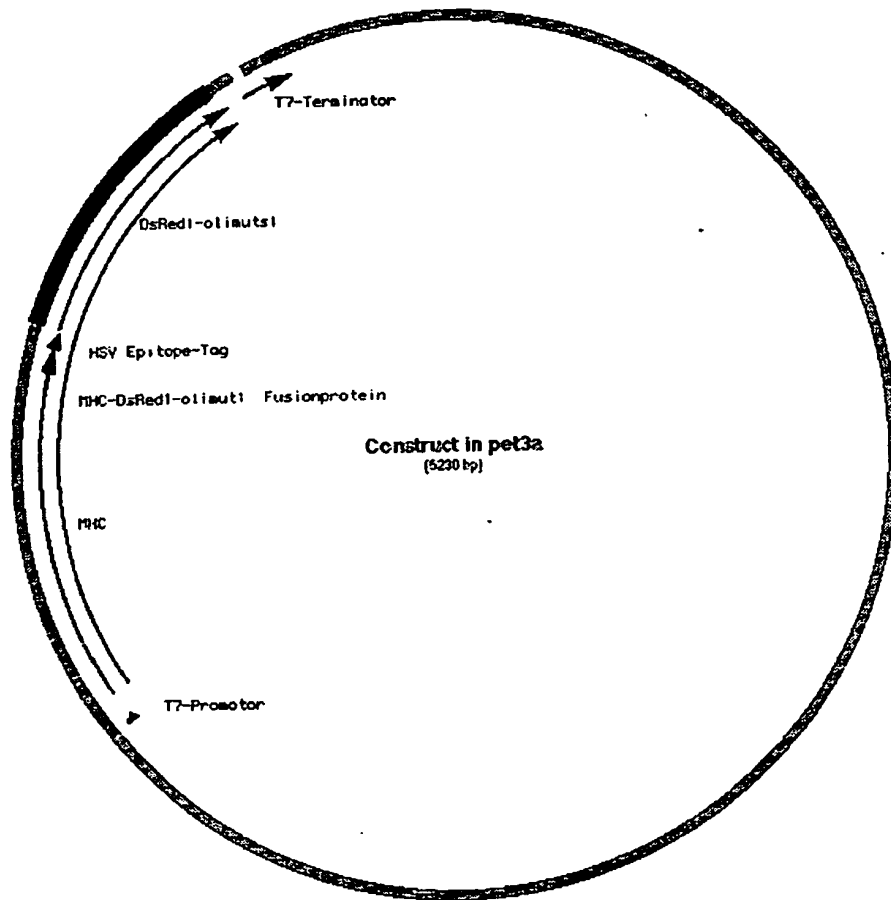


Abb. 1.: Schematische Darstellung einer MHC-DsRed Expressions-Kassette im Vektor pet3a.

2/8

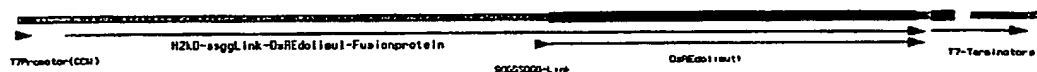


Abb. 2.: Schematische Darstellung der wesentlichen Bestandteile einer weiteren MHC-DsRed Expressions-Kassette.

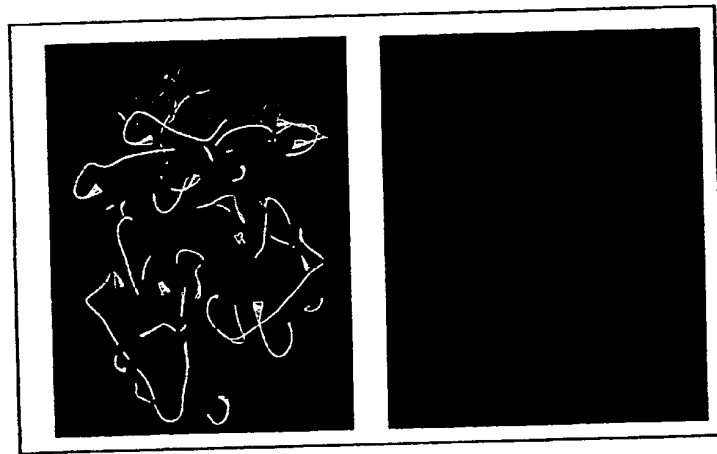


Abb. 3.: MHC-Protein (Schwerekette und β_2 -Mikroglobulin).

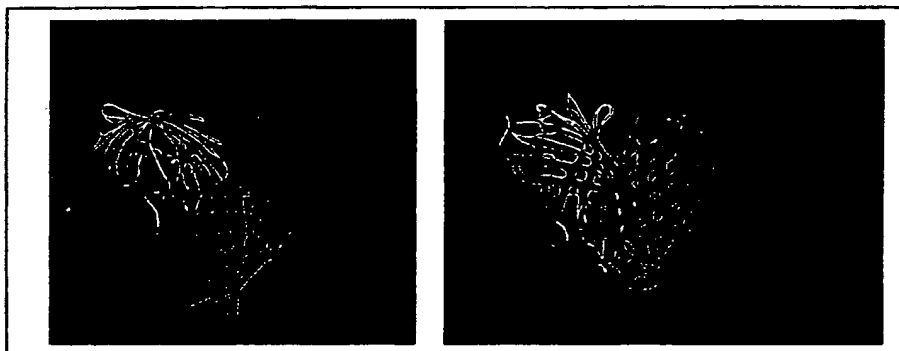


Abb. 4.: Räumliche Darstellung des *DsRed1*-Tetramers.

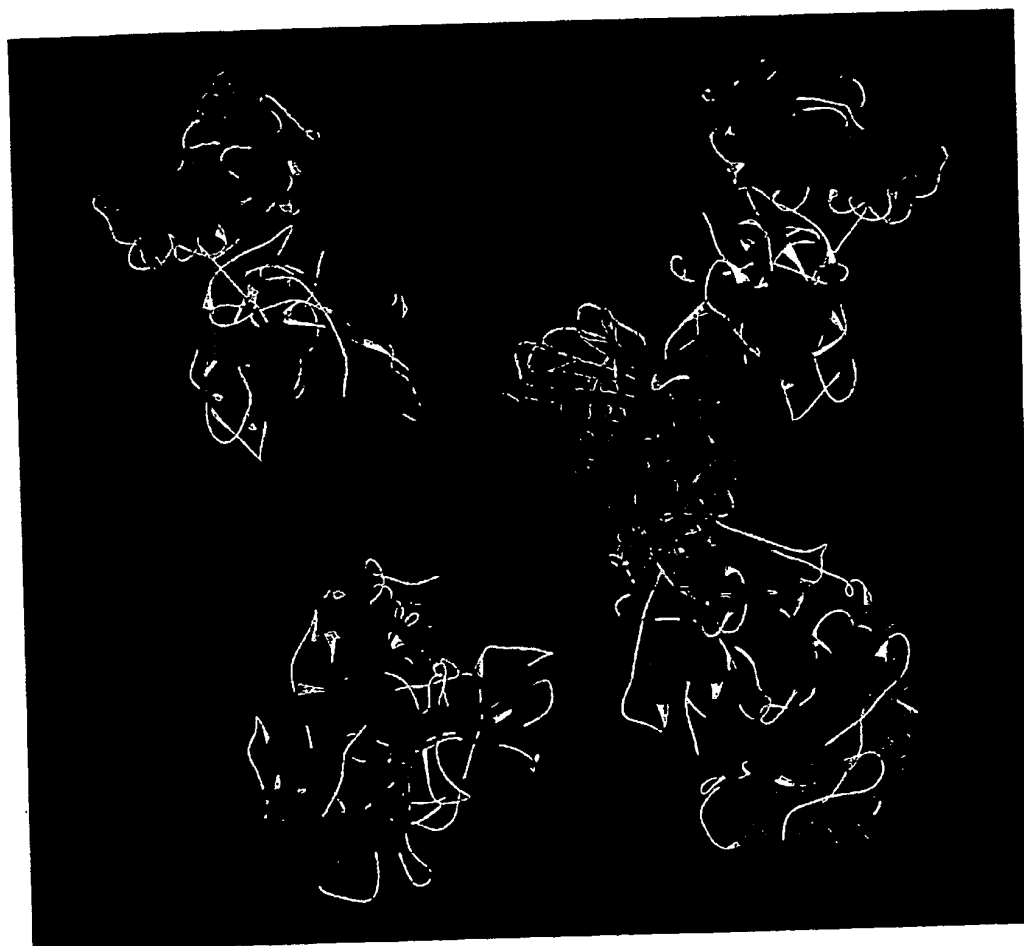


Abb. 5.: MHC-DsRed Tetramer



Abb. 6.: MHC-DsRed Tetramer

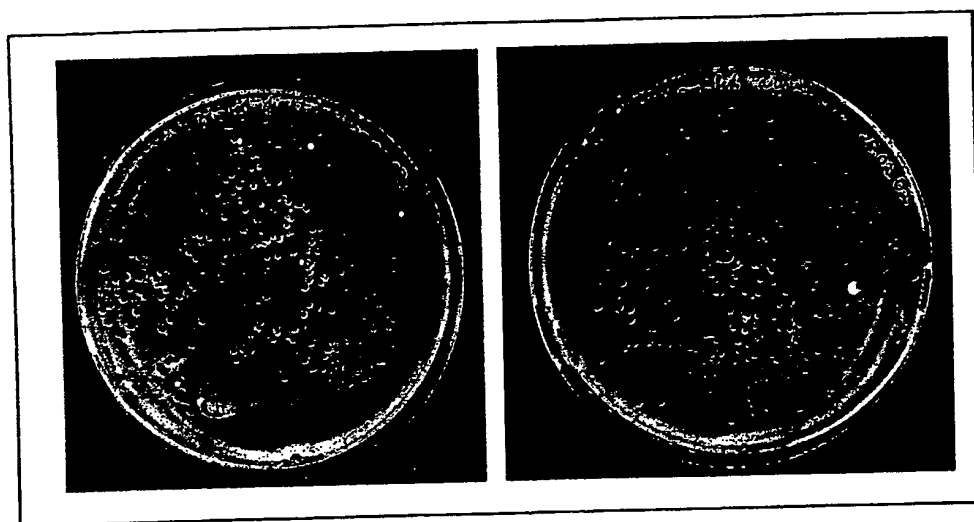


Abb. 7.: MHC-DsRed-Fusionsprotein exprimierende Bakterien-Kolonien.

8/8

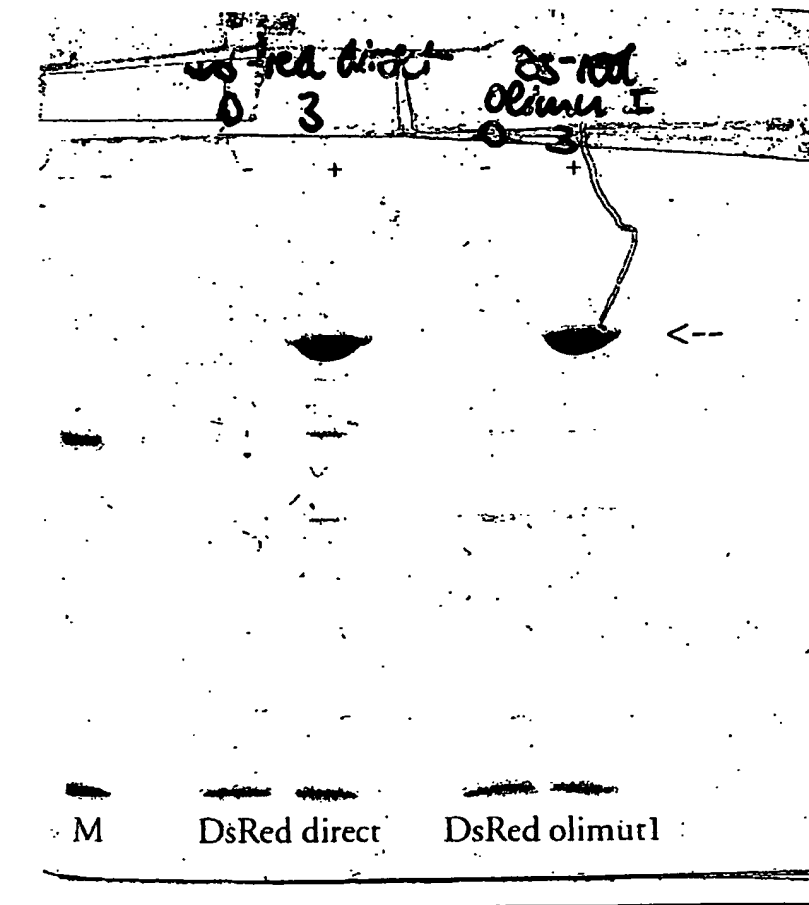


Abb. 8.: Rekombinante Expression von MHC-DsRed-Fusionsprotein

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/03995

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/62 C07K14/705

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01 18053 A (DAVODEAU FRANCOIS ; INST NAT SANTE RECH MED (FR); LANG FRANCOIS (FR) 15 March 2001 (2001-03-15) the whole document	1-3
A	WO 00 42181 A (DOLSTRA HARMEN ; INTROGENE BV (NL); VERLINDEN STEFAN FREDERIK FRAN) 20 July 2000 (2000-07-20) abstract page 10, line 7 - line 12 -/--	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 August 2002

Date of mailing of the international search report

10/09/2002

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/03995

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,P	<p>LAUF U. ET AL: "Expression of fluorescently tagged connexins: a novel approach to rescue function of oligomeric DsRed-tagged proteins" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 498, no. 1, 1 June 2001 (2001-06-01), pages 11-15, XP004243316 ISSN: 0014-5793 the whole document First published on line 10 May 2001</p>	1-3
Y	<p>VRZHESHCH P V ET AL: "Denaturation and partial renaturation of a tightly tetramerized DsRed protein under mildly acidic conditions" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 487, no. 2, 29 December 2000 (2000-12-29), pages 203-208, XP004337961 ISSN: 0014-5793 the whole document</p>	1-3
A	<p>DUNBAR P R ET AL: "Cutting edge: rapid cloning of tumor-specific CTL suitable for adoptive immunotherapy of melanoma." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) UNITED STATES 15 JUN 1999, vol. 162, no. 12, 15 June 1999 (1999-06-15), pages 6959-6962, XP002210381 ISSN: 0022-1767 the whole document</p>	1-3
A	<p>BALDWIN K K ET AL: "Negative selection of T cells occurs throughout thymic development." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) UNITED STATES 15 JUL 1999, vol. 163, no. 2, 15 July 1999 (1999-07-15), pages 689-698, XP002210382 ISSN: 0022-1767 the whole document</p>	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
information on patent family members

International Application No
PCT/EP 02/03995

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0118053	A	15-03-2001	FR 2798128 A1	09-03-2001
			AU 7298100 A	10-04-2001
			CN 1321167 T	07-11-2001
			DE 1127072 T1	23-05-2002
			EP 1127072 A1	29-08-2001
			WO 0118053 A1	15-03-2001
WO 0042181	A	20-07-2000	EP 1020519 A1	19-07-2000
			AU 2332000 A	01-08-2000
			EP 1141280 A1	10-10-2001
			WO 0042181 A1	20-07-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/03995

A. KLASSTFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/62 C07K14/705

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 01 18053 A (DAVODEAU FRANCOIS ; INST NAT SANTE RECH MED (FR); LANG FRANCOIS (FR) 15. März 2001 (2001-03-15) das ganze Dokument	1-3
A	WO 00 42181 A (DOLSTRA HARMEN ; INTROGENE BV (NL); VERLINDEN STEFAN FREDERIK FRAN) 20. Juli 2000 (2000-07-20) Zusammenfassung Seite 10, Zeile 7 - Zeile 12 --- -/--	1-3

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. August 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

10/09/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Panzica, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/03995

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A,P	LAUF U. ET AL: "Expression of fluorescently tagged connexins: a novel approach to rescue function of oligomeric DsRed-tagged proteins" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 498, Nr. 1, 1. Juni 2001 (2001-06-01), Seiten 11-15, XP004243316 ISSN: 0014-5793 das ganze Dokument First published on line 10 May 2001	1-3
Y	VRZHESHCH P V ET AL: "Denaturation and partial renaturation of a tightly tetramerized DsRed protein under mildly acidic conditions" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 487, Nr. 2, 29. Dezember 2000 (2000-12-29), Seiten 203-208, XP004337961 ISSN: 0014-5793 das ganze Dokument	1-3
A	DUNBAR P R ET AL: "Cutting edge: rapid cloning of tumor-specific CTL suitable for adoptive immunotherapy of melanoma." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) UNITED STATES 15 JUN 1999, Bd. 162, Nr. 12, 15. Juni 1999 (1999-06-15), Seiten 6959-6962, XP002210381 ISSN: 0022-1767 das ganze Dokument	1-3
A	BALDWIN K K ET AL: "Negative selection of T cells occurs throughout thymic development." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) UNITED STATES 15 JUL 1999, Bd. 163, Nr. 2, 15. Juli 1999 (1999-07-15), Seiten 689-698, XP002210382 ISSN: 0022-1767 das ganze Dokument	1-3

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/03995

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0118053 A	15-03-2001	FR 2798128 A1	09-03-2001
		AU 7298100 A	10-04-2001
		CN 1321167 T	07-11-2001
		DE 1127072 T1	23-05-2002
		EP 1127072 A1	29-08-2001
		WO 0118053 A1	15-03-2001
WO 0042181 A	20-07-2000	EP 1020519 A1	19-07-2000
		AU 2332000 A	01-08-2000
		EP 1141280 A1	10-10-2001
		WO 0042181 A1	20-07-2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USP.c.